

史文静, 潘丽, 邵科普, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯-牛骨蛋白(EGCG-BBP)偶联物对乳化肉丸蛋白结构及氧化稳定性的影响[J]. 食品工业科技, 2024, 45(17): 21-29. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110279

SHI Wenjing, PAN Li, SHAO Kepu, et al. Effects of Epigallocatechin-3-Gallate-Bovine Bone Protein (EGCG-BBP) Conjugate on the Structure and Oxidative Stability of Protein in Emulsified Meatballs[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(17): 21-29. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110279

· 特邀主编专栏—生物大分子: 性质、结构、特性和功效机制 (客座主编: 于寒松、方亚鹏、刘回民) ·

表没食子儿茶素没食子酸酯-牛骨蛋白 (EGCG-BBP) 偶联物对乳化肉丸蛋白 结构及氧化稳定性的影响

史文静, 潘丽, 邵科普, 陈静雅, 李扬扬, 王庆玲*
(石河子大学食品学院, 新疆石河子 832003)

摘要: 为探究表没食子儿茶素没食子酸酯-牛骨蛋白 (Epigallocatechin-3-gallate-Bovine bone protein, EGCG-BBP) 对乳化肉制品蛋白结构及贮藏氧化稳定性的影响, 本文研究不同 EGCG-BBP 添加量对生肉糜中肌原纤维蛋白 (Myofibrillar protein, MP) 的理化性质、结构特性以及对肉丸氧化特性的影响。结果表明: 当 EGCG-BBP 添加量为 0.8% 时, 肉糜中 MP 的巯基含量最高, 达 4.06 nmol/mg 蛋白, 且羰基含量及表面疏水性最低, 能够有效提升乳化肉制品的抗氧化能力。由红外光谱分析表明, 与未添加 EGCG-BBP 组相比, 添加共价物肉糜中 MP 的酰胺 A 带峰值所对应的波数明显增大, 说明 MP 的二级结构会随之发生改变; 荧光光谱显示, 随贮藏时间延长, 对照组中 MP 的最强荧光波长发生显著红移, 但随 EGCG-BBP 浓度的增加, 红移程度显著降低, 表明添加 EGCG-BBP 能够改变 MP 的三级结构。此外, 乳化肉丸贮藏过程中的氧化指标分析表明, 添加 0.8% EGCG-BBP 能显著降低肉丸的过氧化值 (PV) 和硫代巴比妥酸值 (TBARS), 从而提高其氧化稳定性。综上所述, EGCG-BBP 能够显著改变 MP 的二、三级结构, 且具有良好的抗氧化性能, 在提升乳化肉制品品质方面具有很大的应用潜力, 为肉品抗氧化型乳化剂的应用提供新的选择。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯-牛骨蛋白 (EGCG-BBP), 蛋白结构, 抗氧化能力, 乳化肉丸

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)17-0021-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023110279



本文网刊:

Effects of Epigallocatechin-3-Gallate-Bovine Bone Protein (EGCG-BBP) Conjugate on the Structure and Oxidative Stability of Protein in Emulsified Meatballs

SHI Wenjing, PAN Li, SHAO Kepu, CHEN Jingya, LI Yangyang, WANG Qingling*

(School of Food Science, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: To investigate the effects of epigallocatechin-3-gallate-bovine bone protein (EGCG-BBP) on the protein structure and storage oxidative stability of emulsified meat products, the effects of adding different concentrations of EGCG-BBP on the physicochemical and structural properties of myofibrillar protein (MP) in raw meat, and on the oxidative stability of meatballs were investigated. The results showed that the addition of 0.8% EGCG-BBP resulted in the highest content of sulfhydryl group of MP (4.06 nmol/mg protein) in the minced meat, while the carbonyl group and surface hydrophobicity values were lowest, effectively improving the antioxidant capacity of the emulsified meat products. Fourier-transform infrared spectroscopy analysis showed that the wave number corresponding to the peak of the amide A band of MP was

收稿日期: 2023-11-26

基金项目: 兵团科技创新人才计划项目 (2023CB013); 兵团指导性科技计划项目 (2022ZD061)。

作者简介: 史文静 (2001-), 女, 本科, 研究方向: 畜产品加工及质量控制, E-mail: 1411336897@qq.com。

* 通信作者: 王庆玲 (1981-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 畜产品加工及质量控制, E-mail: qingling1100@163.com。

significantly increased in the minced meat supplemented with EGCG-BBP compared with the control group, indicating corresponding changes in the secondary structure of MP. The fluorescence spectra showed that there was a significant red shift in the strongest MP wavelength in the control group with a prolongation of the storage time. However, this shift was significantly reduced as the concentration of EGCG-BBP increased. This suggested that the addition of EGCG-BBP changed the tertiary structure of MP. Furthermore, analysis of oxidation indices during storage of the emulsified meatballs showed that the addition of 0.8% EGCG-BBP significantly reduced the values of both PV values and TBARS in the meatballs, thereby improving their oxidative stability. In summary, EGCG-BBP can significantly alter both the secondary and tertiary structures of MP and has good oxidation resistance. This indicates its potential to enhance the quality of emulsified meat products and provides a new choice for the application of antioxidant emulsifiers in meat products.

Key words: epigallocatechin-3-gallate-bovine bone protein (EGCG-BBP); protein structure; antioxidant capacity; emulsified meatballs

乳化肉制品具有口感细腻、鲜嫩多汁、营养丰富等优良特点,广受消费者喜爱。尽管乳化剂在乳化肉制品的加工贮藏过程中起到了重要的品质稳定作用,然而随贮藏时间延长,乳化肉制品仍可能出现保水性及保油性降低、蒸煮损失升高等问题^[1]。此外,营养组分氧化也是乳化肉制品加工亟待解决的产业问题。因此,新型抗氧化型乳化剂的开发对加快乳化肉制品的产业化进程至关重要。

近年来,国内畜禽等肉类产量呈现逐年增长趋势^[2]。2022 年我国牛肉产量为 718 万吨,较 2021 年增长了 3.7%^[3]。牛骨,作为肉制品加工的主要副产物,占胴体质量的 20%~25%^[4-5],其蛋白质含量高达 25%,具有很高的营养价值,但由于加工技术的落后,骨汤、骨钙片、骨质饲料等低附加值产品并未实现资源利用的最大化。作为一种优质的动物蛋白,牛骨蛋白(Bovine bone protein, BBP)溶解性低且易氧化的性质限制了其在食品工业中的应用。研究表明,多酚共价修饰蛋白质不仅能保留多酚的生物活性,而且能赋予蛋白质新的特性,使其在乳化食品中的应用成为可能^[6-7]。

目前,有关牛骨蛋白的研究主要集中于其提取方法、结构及其水解物^[8-9],通过化学修饰改善 BBP 自身功能特性的研究较少。团队前期研究结果表明:多酚-蛋白质共价物具有较强的抗氧化能力,且表现出显著乳化性能^[7,10]。因此,本研究进一步考察不同添加量的表没食子儿茶素没食子酸酯-牛骨蛋白(Epigallocatechin-3-gallate-Bovine bone protein, EGCG-BBP)对肉糜贮藏期间(0~12 d)肌原纤维蛋白(Myofibrillar protein, MP)理化、结构特性及肉丸氧化稳定性的影响,研究结果将为 EGCG-BBP 在乳化肉制品中的应用提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛骨、猪里脊肉、猪背膘 购于石河子市农贸市场;EGCG、乙酸乙酯、氯仿、碘化钾、TBA、三氯乙酸、1,1,3,3-四乙氧基丙烷、溴酚蓝、8-苯胺-1-萘胺磺酸、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) 麦克林试剂有限公司;以上化学试剂均为分析纯。

Neofuge-15R 型酶标仪 美国伯爵仪器有限公司; Beta 2-8 LD plus 型荧光分光光度计 美国 Varian 公司; Vertex 70 型傅里叶变换红外光谱(FTIR) 德国 Bruker 公司; IKA® T25 digital 型高速剪切机 艾卡(广州)仪器设备有限公司; ZBJ-40 型斩拌机 上海友谊机械设备公司; KH19A 型冷冻离心机 湖南凯达科学仪器有限公司; PGJ-300 型破骨机、GNM-130AQ 型骨泥机 廊坊汇友机械有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 BBP 的提取及其共价物的制备 采用刁静静^[11]描述的碱法提取制备 BBP,并略有修改。剔除脂肪、筋膜等非骨成分的新鲜牛骨用破骨机和骨泥机破碎成 $0.1 \times 0.1 \times 0.1 \text{ cm}^3$ 的颗粒,将其在 0.3 mol/L HCl 中浸泡 12 h。浸泡结束,用清水洗净后置于 $0.1\% \text{ Ca(OH)}_2$ 溶液中浸泡 12 h。然后,将用清水冲洗后的骨碎片在 85°C 下煮沸 4 h,最后过滤得到 BBP 溶液,冷冻干燥保存备用。凯氏定氮法测定 BBP 的蛋白质含量^[12]。

EGCG-BBP 共价物的制备参照 Liu 等^[13]的方法并稍作修改。先将 EGCG 溶于去离子水中,然后将 1.26 g BBP 溶于 50 mL 去离子水中,用 0.1 mol/L NaOH 将 EGCG 溶液调至 $\text{pH}9.0$ 并搅拌 12 h 后,与 BBP 溶液混合(1/1, v/v)。混合液搅拌 24 h 后,透析至渗透液在 350 nm 至 450 nm 的吸光度小于 0.002 ^[14],冷冻干燥。EGCG 用量为 $250 \mu\text{mol/g BBP}$ 。

1.2.2 FTIR 分析共价物二级结构 共价物的二级结构利用红外光谱仪测定,在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 范围内采用透射率法测定。按照 KBr 压片法制备样品。在 32 次扫描时记录光谱。使用 OMNIC 9.2.86 将各光谱中酰胺 I 带($1700 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$)的透过率转化为吸光度。对处理后的蛋白图谱进行自解卷积,利用 Peak Fit v4.12 进行曲线拟合,解析蛋白二级结构的主要吸收峰。

1.2.3 乳化肉丸的制作 新鲜里脊和背膘肉分别绞碎,将瘦肉粒低速斩拌 1 min 后,加入全部盐和总量 $1/3$ 的冰水;停止斩拌 1.5 min,加入脂肪高速斩拌 1 min 后加入剩余冰水,继续高速斩拌 4 min,过程中

加入 EGCG-BBP 和其他配料,其中未添加多酚作为对照组(CG),整个斩拌温度不超过 10 ℃。所得肉糜分为两组:一组置于低密度聚乙烯袋中;另一组经 80 ℃ 煮制 10 min,熟化后制成猪肉肉丸(直径约 30 mm,每个 5 g),真空包装后-4 ℃ 贮藏 12 d,每 3 d 测定相关指标。EGCG-BBP 肉糜的配方如表 1 所示。

表 1 EGCG-BBP 肉糜的配方
Table 1 Formula of EGCG-BBP meat paste

配料(g)	对照组	EGCG-BBP添加量				
	CG	0.1%	0.2%	0.5%	0.8%	1%
猪里脊肉	140	140	140	140	140	140
猪背膘	36	36	36	36	36	36
EGCG-BBP	-	0.24	0.48	1.2	1.92	2.4
冰水	54.4	54.16	53.92	53.2	52.48	52
食盐	4	4	4	4	4	4
糖	1	1	1	1	1	1
白胡椒粉	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6

1.2.4 肉糜中 MP 的提取 MP 的提取参考 Park 等^[15]的方法,并稍作修改。具体步骤如下:将 1.2.3 中制备的肉糜按照 1:4(w/v)比例与 10 mmol/L 的磷酸盐(PBS)缓冲液(pH7.0)混合,均质(9000 r/min, 30 s)后离心(4500 r/min, 4 ℃)15 min,弃上清液后收集沉淀。按照 1:4(w/v)溶于 0.1 mol/L NaCl 溶液中,按照上述条件均质、离心洗涤四次,沉淀即为 MP。

1.2.5 MP 的理化特性分析

1.2.5.1 巯基含量的测定 共价物的巯基含量根据 Ellman 试剂方法^[16]测定。称取 16 mg 样品溶于 5 mL Tris-甘氨酸缓冲液(pH8.0)中,加入 50 μL Ellman 试剂,涡旋 30 min,于 412 nm 处测定吸光度。巯基含量的计算公式如下:

$$\text{巯基含量(nmol/mg)} = \frac{A_{412} \times 10^6}{1.36 \times 10^4 \times C} \quad \text{式 (1)}$$

式中:1.36×10⁴ 为摩尔消光系数,C 表示样品蛋白浓度,mg/mL。

1.2.5.2 羰基含量的测定 根据 Oliver 等^[17]的方法,采用 2,4-二硝基苯肼(DNPH)测定羰基含量,并稍作修改。将 1 mL 4 mg/mL 蛋白样品与 1 mL 10 mmol/L DNPH 混合后暗反应 1 h 后加入 1 mL 20% TCA,6000 r/min 离心 15 min 以终止反应。用 1 mL 乙醇/乙酸乙酯溶液(1:1, v/v)洗涤沉淀物 3 次将其重新溶于 3 mL 6 mol/L 盐酸胍,37 ℃ 孵育 15 min。在 370 nm 处测定其反应液的吸光度,羰基含量以 nmol/mg 蛋白表示。蛋白质羰基的吸收系数为 22000 (mol/L)⁻¹cm⁻¹。

$$\text{羰基含量(nmol/mg)} = \frac{A_{370} \times 10^6}{22000 \times C} \quad \text{式 (2)}$$

式中:10⁶ 为摩尔基础单位,C 表示样品蛋白浓度,mg/mL。

1.2.5.3 表面疏水性的测定 参照 Wang 等^[18]的方法,并稍作修改。1 mL 蛋白质溶液(2 mg/mL)加入 200 μL 溴酚蓝溶液后于 4 ℃,6000 r/min 离心 15 min,其上清液于 595 nm 波长处测定吸光度,相同条件下无蛋白质的磷酸盐溶液作为空白(A₀),以溴酚蓝结合量表示表面疏水性,公式如下:

$$\text{溴酚蓝结合量(}\mu\text{g)} = \frac{A_0 - A_{\text{样}}}{A_0} \times 200 \quad \text{式 (3)}$$

1.2.6 MP 的结构特性分析

1.2.6.1 FTIR 的测定 参照 1.2.2 的方法。

1.2.6.2 荧光光谱的测定 通过荧光分光光度计测定荧光光谱。样品浓度为 0.2 mg/mL。具体设定程序如下:激发波数固定为 275 cm⁻¹,发射波数范围为 280~400 cm⁻¹。

1.2.6.3 SDS-PAGE 的测定 样品的还原型 SDS-PAGE 分析参照 Zhong 等^[19]的方法,略作修改。15 μL 2 mg/mL 各样品置于凝胶泳道,选择 15% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行电泳。电泳初始电压为 120 V,当样品进入分离胶时,电压升至 160 V。

1.2.7 肉丸的氧化特性

1.2.7.1 肉丸过氧化值(PV)的测定 称取 2.5 g 肉丸样品并加入 12.5 mL 乙酸乙酯和氯仿混合溶剂(2:1, v/v),再加入 1 mL 饱和碘化钾溶液并静置 1 min,用 0.1 N 硫代硫酸钠滴定释放的碘,直至蓝色消失。相同条件下蒸馏水替代肉丸作为空白,计算公式如下^[20]:

$$\text{PV(meq/kg)} = \frac{N \times (V_{\text{样}} - V_{\text{空}}) \times 1000}{W_{\text{样}}} \quad \text{式 (4)}$$

式中:N 表示硫代硫酸钠的当量, mol/L; V_样表示样品消耗的硫代硫酸钠的体积, mL; V_空表示空白样品消耗的硫代硫酸钠的体积, mL; W_样表示样品的质量, g。

1.2.7.2 肉丸硫代巴比妥酸值(TBARs)的测定 乳化肉丸的 TBARs 值按照 Ghimire 等^[21]的方法测定,并稍作修改。将 2.5 g 肉丸样品加入 7.5 mL 蒸馏水并均质化,并于 6000 r/min 离心 15 min。取 1 mL 上清液与 6 mL TBA 溶液(15% TCA 和 0.375% TBA 溶于 0.25 mol/L HCl)混合并于沸水加热 15 min,室温下快速冷却,10000 r/min 下离心 10 min。测定反应混合上清液在 532 nm 处的吸光度,用蒸馏水代替样品溶液作为空白。TBARs 值用 1,1,3,3-四乙氧基丙烷标准品绘制标准曲线计算而得,单位为 mg/kg。标曲方程:y=0.0105x-0.0002,决定系数:R²=0.9991。

1.3 数据处理

各实验平行测定三次,结果以平均值±标准差表示。采用 Excel(2019)记录和计算数据,采用 SPSS 26.0 进行统计分析。ANOVA 确定单因素方差分析,Duncan 多重极差检验(以 P<0.05 为有显著性差

异的标准)确定样本间显著性差异。

2 结果与分析

2.1 共价物二级结构的分析

FTIR 光谱可以测定蛋白质与多酚共价后二级结构的变化。如图 1A 所示,与 BBP 相比,EGCG-BBP 的酰胺 A 带的峰形更宽,且最大吸收波数偏移至 3342.46 cm^{-1} 。酰胺 A 带的差异主要是多酚中 O-H 与蛋白质中 N-H 共同伸缩振动所致。这表明 EGCG 与 BBP 成功共价结合形成酰胺键。有研究也证实了多酚与蛋白质的共价结合可以显著改变酰胺带的峰强度和位置^[22]。

酰胺 I 带和酰胺 II 带都可以用来表征和计算蛋白质的二级结构含量^[23]。然而,为了能够准确计算,酰胺 I 带($1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$)经常计算相应二级结构拟合峰面积的比例。如图 1B 所示,与 BBP 相比,EGCG-BBP 的 α -螺旋和 β -折叠含量分别明显降低至 17.52% 和 20.76%。多酚能够维持蛋白质内部二硫键的还原作用,抑制了蛋白质分子间的聚集,从而导致无规则卷曲和 β -转角含量增加, α -螺旋和 β -折叠的含量减少^[24]。Fan 等^[25]研究表明,改性后 WPI-EGCG 中 α -螺旋含量显著降低。综上所述,EGCG 共价修饰后 BBP 的二级结构发生了改变,表明它们之间存在交联。

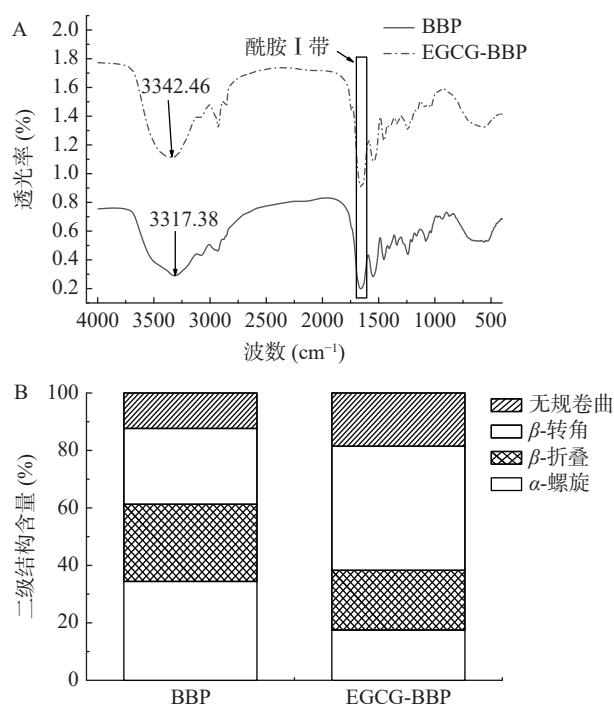


图 1 共价物的结构特性

Fig.1 Structural properties of conjugates

注: A: 共价物的傅里叶变换红外光谱; B: 共价物的二级结构分布图。

2.2 肉糜中 MP 的理化特性

由图 2A 可知,随贮藏期延长,各组 MP 的巯基含量呈显著($P<0.05$)下降的趋势。这可能是由于贮藏过程中,肉糜中 MP 受到外界自由基的攻击而氧

化所致^[26]。新鲜肉糜中 EGCG-BBP 的添加导致不同组 MP 的巯基含量产生显著($P<0.05$)差异,表现为 EGCG-BBP 的添加量越高,巯基含量越高。这可能是酚类物质会掩盖巯基结合位点,阻碍蛋白质之间以二硫键结合所致^[27]。贮藏至 12 d,EGCG-BBP 的添加使得肉糜中 MP 的巯基含量更高。这表明 EGCG-BBP 能够有效抑制肉糜在贮藏过程中的氧化。类似的研究结果也有报道,Walayath^[28]研究发现 6% 蛋清蛋白-低聚糖复合物能有效延缓冻藏鱼中 MP 的巯基含量降低。此外,也有研究证明鱼鳞明胶对鱼糜 MP 具有一定的冷冻保护作用^[29]。

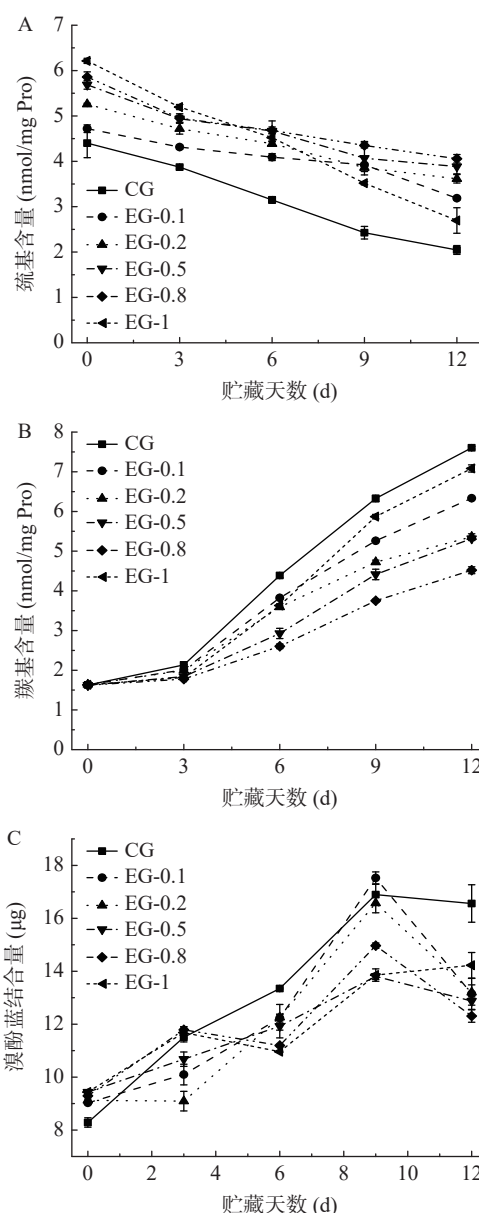


图 2 不同贮藏期内肉糜中 MP 的理化指标

Fig.2 Physicochemical indexes of MP in minced meat during different storage periods

注: CG: 为不加 EGCG-BBP 所制备肉糜提取的 MP; EG-0.1: 为 0.1% EGCG-BBP 所制备肉糜提取的 MP; EG-0.2: 为 0.2% EGCG-BBP 所制备肉糜提取的 MP; EG-0.5: 为 0.5% EGCG-BBP 所制备肉糜提取的 MP; EG-0.8: 为 0.8% EGCG-BBP 所制备肉糜提取的 MP; EG-1: 为 1% EGCG-BBP 所制备肉糜提取的 MP; 图 3~图 6 同。

由图 2B 可知,新鲜肉糜中 MP 的羰基含量差异不显著($P>0.05$),但随贮藏时间的延长,各组的羰基含量均呈显著($P<0.05$)上升趋势,与 CG 组相比,添加 EGCG-BBP 后羰基含量显著性($P<0.05$)降低。这表明贮藏过程中肉糜发生显著氧化现象,但 EGCG-BBP 的添加能显著($P<0.05$)抑制 MP 的氧化。此外,贮藏至 12 d,EG-0.8 处理组的羰基含量显著低于对照组($P<0.05$)。本研究结果与贮藏过程中肉糜巯基含量的变化结果一致。类似的研究表明,EGCG 和 EGC 与蛋白形成的复合物能够显著抑制羰基含量的增加^[30]。

如图 2C 所示,新鲜肉糜中添加 EGCG-BBP 使得 MP 的表面疏水性升高,这可能是共价物的添加使 MP 中疏水性基团暴露所致。随贮藏期延长,各肉糜中 MP 的表面疏水性整体呈现上升趋势。这是贮藏过程中 MP 氧化而导致结构松散,内部疏水性氨基酸暴露所致^[31]。贮藏至 12 d,与 CG 相比,添加 EGCG-BBP 肉糜中 MP 的表面疏水性显著降低($P<0.05$),其中 EG-0.8 处理组的表面疏水性低至 12.31 μg 。这说明 EGCG-BBP 有效抑制了 MP 的氧化。本研究结果与上述巯基和羰基含量结果相一致。

2.3 肉糜中 MP 的结构特性

2.3.1 MP 二级结构的分析 红外光谱常作为表征蛋白质二级结构的重要手段之一。如图 3 所示,贮藏初始(0 d),与 CG 相比,添加 EGCG-BBP 肉糜中 MP 的酰胺 A 带($3200\sim 3500\text{ cm}^{-1}$)峰值所对应的波数均增大,且波数的变化程度随着 EGCG-BBP 浓度增加而显著增加(从 3413.82 cm^{-1} 增加至 3433.11 cm^{-1})。这可能是由于 EGCG-BBP 的添加,影响了原本 MP 中 C-H 和 N-H 键的伸缩振动所致^[32-33]。同时,将

EGCG 添加到肉糜中增加了 MP 之间的交联和氢键形成^[34]。但随着贮藏时间的延长,添加 EGCG-BBP 肉糜中 MP 的酰胺 A 带峰值强度与 CG 相比差异显著降低。这归因于贮藏过程中,部分蛋白质发生氧化和降解,从而减少蛋白质的相互作用。

酰胺 I 带($1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$)常用来计算蛋白质中二级结构的含量分布。如图 4 所示,贮藏 0 d,各肉糜中 MP 的各二级结构含量差异不大。但是与 CG 组相比,EGCG-BBP 的添加使肉糜中 MP 的 α -螺旋降低而 β -折叠含量增加,这可能是 EGCG-BBP 与 MP 发生非共价相互作用使 MP 结构变得松散所致^[35-36]。本研究结果与 Huang 等^[37]研究相似,肌原纤维蛋白 α -螺旋含量与迷迭香酸、鼠尾草酸和鼠尾草酚剂量呈负相关。此外,研究表明, α -螺旋向 β -折叠转变能提高蛋白质的乳化特性,这与之前的研究结果相一致^[38]。随贮藏时间的延长,各肉糜中 MP 的二级结构均有所变化。贮藏至 12 d,添加 EGCG-BBP 的肉糜中 MP 的 α -螺旋含量高于 CG 组,这是由于贮藏过程中 MP 自身氧化产物与脂质氧化产物共同作用所致^[39]。此外 EG-1 组的 α -螺旋略低于 CG 组,这可能归因于此添加量下肉糜的保油性较低。

2.3.2 MP 三级结构的分析 荧光光谱能够反映蛋白质的三级结构变化。如图 5 所示,随贮藏时间的延长,各肉糜所提取 MP 的最大荧光强度所对应的波数呈现先增大后降低的趋势,从最初的 328.4 nm 增大至 331.5 nm ,而最终降低至 329.0 nm 。这可能是肉糜在贮藏过程中 MP 受到轻微氧化、降解所致。贮藏 6 d 与新鲜肉糜相比,CG 组中 MP 的最强荧光波长发生了显著红移;随 EGCG-BBP 浓度的增加,红移程度显著降低。这是由于 EGCG-BBP 具有抗氧化特性,能有效抑制肉糜贮藏过程中的氧化。

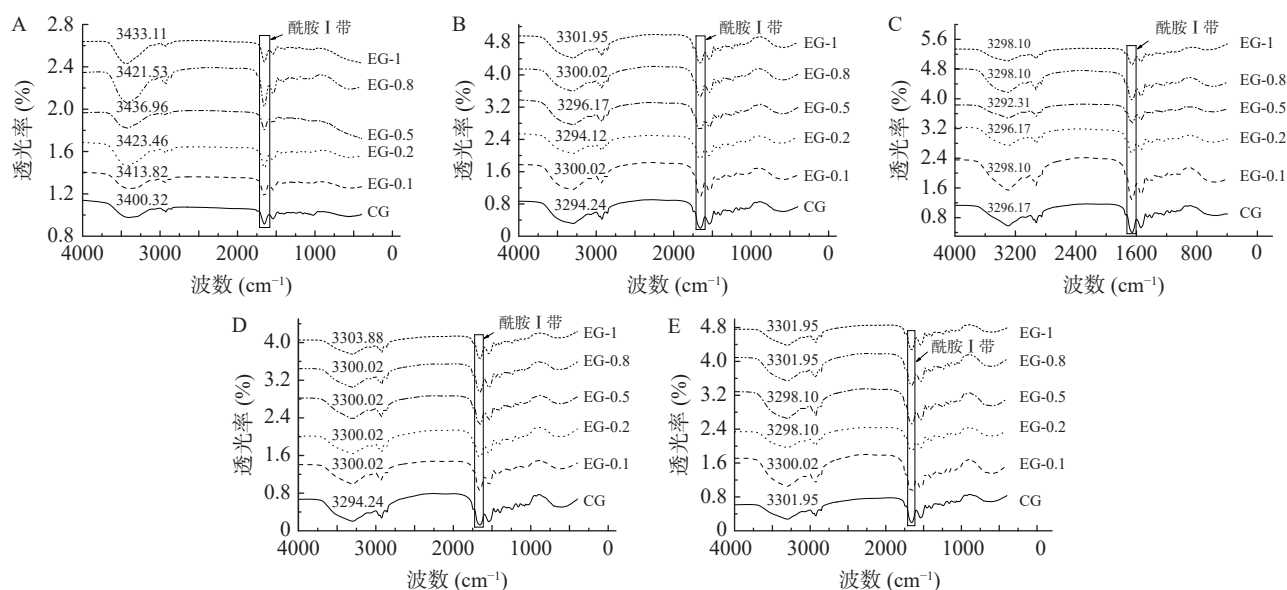


图 3 不同贮藏期内肉糜中 MP 的 FTIR

Fig.3 FTIR of MP in minced meat during different storage periods

注: A~E: 依次为贮藏 0、3、6、9、12 d 各肉糜中 MP 的红外光谱。

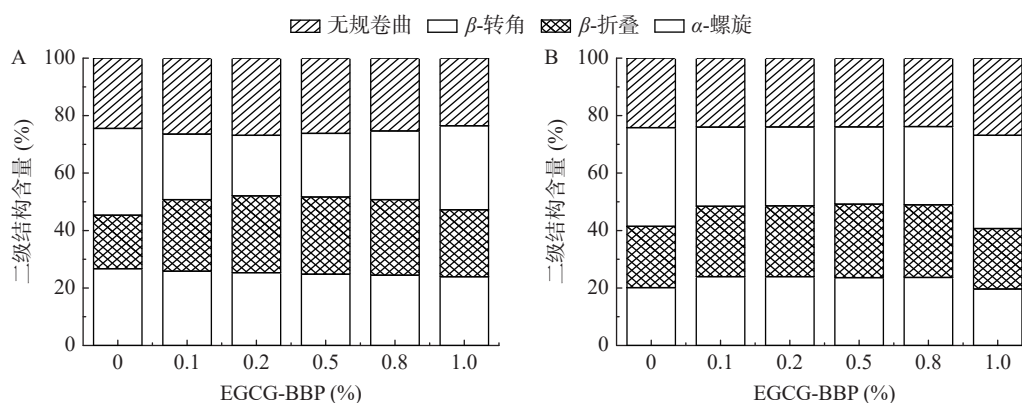


图4 贮藏过程中肉糜中MP的二级结构含量

Fig.4 Secondary structure content of MP in each minced meat during storage

注: A: 为贮藏0 d肉糜中MP的二级结构含量; B: 为贮藏12 d肉糜中MP的二级结构含量。

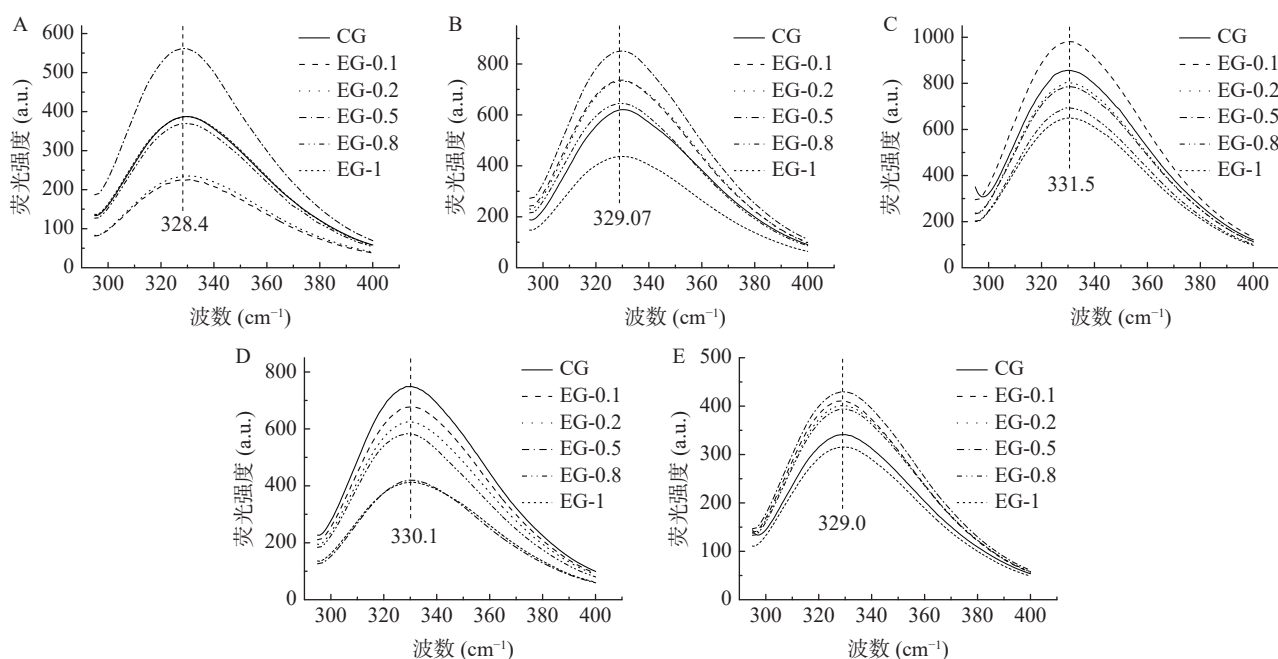


图5 不同贮藏期内肉糜中MP的荧光光谱

Fig.5 Fluorescence spectra of MP in minced meat during different storage periods

注: A~E: 依次为贮藏0、3、6、9、12 d各肉糜中MP的荧光光谱。

2.3.3 MP的SDS-PAGE分析 SDS-PAGE不仅能直接反映出蛋白质分子量,还能判断处理、加工、贮藏等过程对蛋白质结构的影响程度。由图6可知,贮藏初始(0 d),各组肉糜中MP均出现了其特有条带:肌球蛋白重链(约250 kDa)、C蛋白(100 kDa)、肌动蛋白(约42 kDa)、肌球蛋白 β 链(约37 kDa)、肌球蛋白 α 链(35 kDa)、肌球蛋白轻链(22 kDa),与CG相比,添加EGCG-BBP肉糜中MP的肌球蛋白重链、肌动蛋白及肌球蛋白 α 链和 β 链的条带强度更强、颜色更深,且上述条带强度随EGCG-BBP浓度增加而显著增强。这表明EGCG-BBP的添加促进了肉糜中MP在特定蛋白质的聚集。随贮藏时间的延长,各肉糜中MP的肌球蛋白重链、C蛋白、肌动蛋白和肌球蛋白 α 及 β 链的条带强度显著降低,这表明各肉糜中蛋白质均发生了降解。贮藏12 d后,与CG组相比,添加EGCG-BBP的肉糜中MP

各条带的强度更强。但EG-1处理组的条带与CG相比强度更弱,这可能是由于过多EGCG-BBP降低了肉糜乳化效果和保水保油性,脂肪氧化产物加速MP降解^[40]。

2.4 肉丸氧化特性的变化

如图7A所示,随贮藏时间延长,各肉丸的PV值均呈现上升趋势。但贮藏至12 d,添加EGCG-BBP的肉丸PV值显著低于CG组($P<0.05$),其中EG-0.8处理组的PV值最低,低至2.35 meq/kg。这是因为EGCG-BBP具有抗氧化能力,能阻止外界的自由基攻击,从而减轻肉丸氧化程度^[41]。这表明EGCG-BBP能显著抑制肉丸在贮藏过程中的脂肪氧化。此外,有研究表明乳清蛋白多肽能显著抑制反复冻融猪肉糜的氧化^[42]。

如图7B所示,在贮藏初始(0 d),各肉丸的TBARs值差异不显著($P>0.05$)。但随贮藏时间的延

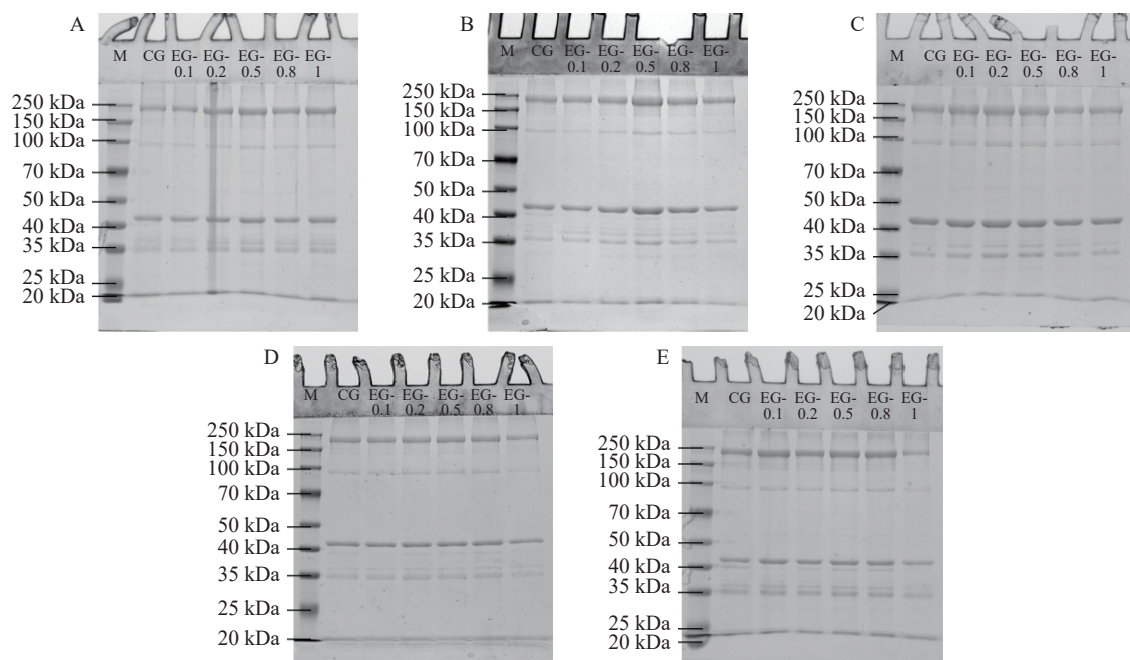


图 6 不同贮藏期内肉糜中 MP 的 SDS-PAGE

Fig.6 SDS-PAGE of MP in minced meat during different storage periods

注: A~E: 依次为贮藏 0、3、6、9、12 d 各肉糜中 MP 的 SDS-PAGE。

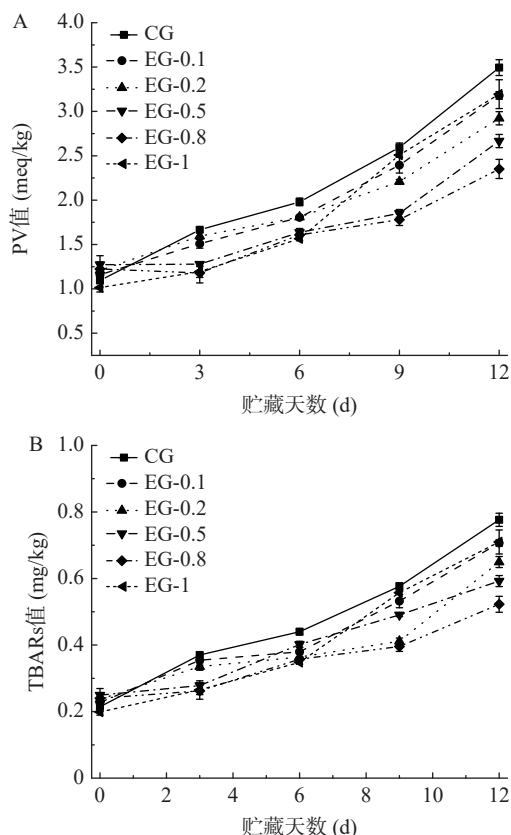


图 7 贮藏过程中肉丸的氧化指标变化

Fig.7 Changes of oxidation indexes of meatballs during storage

注: CG: 为不加 EGCG-BBP 所制作肉丸; EG-0.1: 为 0.1% EGCG-BBP 所制作肉丸; EG-0.2: 为 0.2% EGCG-BBP 所制作肉丸; EG-0.5: 为 0.5% EGCG-BBP 所制作肉丸; EG-0.8: 为 0.8% EGCG-BBP 所制作肉丸; EG-1: 为 1% EGCG-BBP 所制作肉丸。

长, 各肉丸的 TBARs 值差异显著 ($P < 0.05$), 特别是贮藏至 12 d, 添加 EGCG-BBP 的肉丸其 TBARs 值

显著 ($P < 0.05$) 低于 CG, 且随 EGCG-BBP 浓度的增加, 肉丸的 TBARs 值呈现出先降低后升高的趋势, 其中添加量为 EG-0.8 处理组的 TBARs 最低, 为 0.52 mg/kg。这表明添加 EGCG-BBP 能够显著抑制肉丸贮藏过程中脂质氧化的次级代谢产物积累^[43]。但同时, 随贮藏期的延长, 各肉丸中 TBARs 值呈现增加趋势。这可能归因于贮藏过程中自由基和蛋白质氧化产物对脂质的攻击。

3 结论

本研究将 EGCG-BBP 应用于乳化肉丸, 探究其不同添加量对贮藏过程中乳化肉糜中 MP 理化和结构特性及肉丸氧化特性的影响。结果表明, EGCG-BBP 的添加能有效抑制肉糜中 MP 氧化, 使得巯基含量下降减缓, 羰基含量和表面疏水性增加减缓, 且显著改变 MP 的二、三级结构, 与对照组相比, 添加 EGCG-BBP 能够有效抑制肉丸脂质氧化。当 EGCG-BBP 添加量为 0.8% 时, MP 能够维持其最佳理化和结构特性, 且对肉丸表现出显著且持续的抗氧化能力。因此, 本研究证明 0.8% EGCG-BBP 在抑制肉丸脂质和蛋白质氧化方面作用效果最佳, 研究为乳化肉制品品质提升提供理论依据, 同时为肉品抗氧化型乳化剂的应用提供新的选择。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 肖怀秋, 李玉珍, 兰立新. 大豆分离蛋白在肉制品加工中的应用[J]. 肉类工业, 2007, 10: 33-36. [XIAO H Q, LI Y Z, LAN L X. Application of soybean isolated proteins in meat products pro-

- cessing[J]. *Meat Industry*, 2007, 10: 33–36.]
- [2] 王馨慧. 中国居民肉类消费及影响因素研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020. [WANG X H. Study on meat consumption and influencing factors of Chinese residents[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2020.]
- [3] 张秀青, 谢兰兰. 国际牛羊肉市场发展趋势及我国面临的风险点分析[J]. *价格理论与实践*, 2022, 452(2): 79–83, 200. [ZHANG X Q, XIE L L. Analysis of the development trend of the international beef and mutton market and the risk points facing China[J]. *Price Theory and Practice*, 2022, 452(2): 79–83, 200.]
- [4] 贾伟. 牛骨营养品质评价与牦牛骨胶原蛋白肽功效研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017. [JIA W. Evaluation of nutritional quality of cow bone and efficacy of collagen peptide in yak bone[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017.]
- [5] 张舒晴. 蒸汽爆破对牛骨理化特性的影响及液化工艺优化研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2020. [ZHANG S Q. The influence of steam blasting on the physical and chemical characteristics of bovine bone and the optimization of liquefaction process[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2020.]
- [6] 李金铭. 基于共价修饰的鸡蛋蛋白-儿茶素复合物制备及应用[D]. 长春: 吉林大学, 2022. [LI J M. Preparation and application of egg protein-catechin complex based on covalent modification[D]. Changchun: Jilin University, 2022.]
- [7] PAN L, CHEN J Y, FU H H, et al. Effects of fabrication of conjugates between different polyphenols and bovine bone proteins on their structural and functional properties[J]. *Food Bioscience*, 2023, 52: 102375.
- [8] 魏洁琼, 余群力, 韩玲, 等. 牛骨胶原蛋白肽制备工艺优化及抗氧化活性分析[J]. *甘肃农业大学学报*, 2020, 55(5): 203–211, 218. [WEI J Q, YU Q L, HAN L, et al. Optimization of preparation process and analysis of collagen peptide antioxidant activity[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2020, 55(5): 203–211, 218.]
- [9] 胡頔. 牛骨胶原蛋白酶解物制备及其生理活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2022. [HU Q. Preparation of collagen enzyme and its physiological activity[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2022.]
- [10] PAN L, LI Q Q, CHEN J Y, et al. Concentration effect of epigallocatechin-3-gallate-bovine bone protein conjugates on emulsion stability[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2023, 675: 132057.
- [11] 刁静静. 猪骨蛋白水解物的抗氧化机理以及在肉制品中应用的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008. [DIAO J J. Studies on the antioxidant mechanism of pig bone protein hydrolysate and its application in meat products[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2008.]
- [12] AOAC. Official methods of analysis (17th ed.)[S]. Gaithersburg, MD, USA: Association of Official Analytical Chemists International, 2000.
- [13] LIU H T, HAN G, ZHANG H, et al. Improving the physical and oxidative stability of emulsions based on the interfacial electrostatic effects between porcine bone protein hydrolysates and porcine bone protein hydrolysate-rutin conjugates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 94: 418–427.
- [14] PAROLIA S, MALEY J, SAMMYNAIKEN R, et al. Structure-functionality of lentil protein-polyphenol conjugates[J]. *Food Chemistry*, 2022, 367: 130603–130612.
- [15] PARK D, XIONG Y L, ALDERTON A L. Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle myofibrillar protein[J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(3): 1239–1246.
- [16] 李菊名. 热处理大豆分离蛋白-EGCG复合物的制备及其作为功能性载体的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021. [LI J M. Preparation of isolated protein-EGCG complex in heat-treated soybean and its use as functional carriers[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.]
- [17] OLIVER C N, AHN B W, MOERMAN E J, et al. Age-related changes in oxidized proteins[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(12): 5488–5491.
- [18] WANG H, SONG Y, LIU Z, et al. Effects of iron-catalyzed and metmyoglobin oxidizing systems on biochemical properties of yak muscle myofibrillar protein[J]. *Meat Science*, 2020, 166: 108041–108047.
- [19] ZHONG Y Y, HAN P, SUN S L, et al. Effects of apple polyphenols and hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes on the oxidation of myofibrillar proteins and microstructures in lamb during frozen storage[J]. *Food Chemistry*, 2022, 375: 131874–131885.
- [20] LI X, LIU A, YE R, et al. Fabrication of gelatin-laponite composite films: Effect of the concentration of laponite on physical properties and the freshness of meat during storage[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 44: 390–398.
- [21] GHIMIRE A, PAUDEL N, POUDEL R. Effect of pomegranate peel extract on the storage stability of ground buffalo (*Bubalus bubalis*) meat[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 154: 112690.
- [22] SUN J, HUANG Y, LIU T, et al. Evaluation of crossing-linking sites of egg white protein-polyphenol conjugates: Fabricated using a conventional and ultrasound-assisted free radical technique[J]. *Food Chemistry*, 2022, 386: 132606.
- [23] WU X L, LU Y Q, XU H X, et al. Reducing the allergenic capacity of β -lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols[J]. *Food Chemistry*, 2018, 256: 427–434.
- [24] 廖珺, 王烨军, 苏有健, 等. 茶多酚对面包纹理结构的影响[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(4): 40–47. [LIAO J, WANG Y J, SU Y J, et al. Effects of tea polyphenols on the texture and structure of the bread[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(4): 40–47.]
- [25] FAN Y T, LIU Y X, GAO L Y, et al. Oxidative stability and in vitro digestion of menhaden oil emulsions with whey protein: Effects of EGCG conjugation and interfacial cross-linking[J]. *Food Chemistry*, 2018, 265: 200–207.
- [26] 吴兴阁. 预调理猪肉糜冻藏过程中品质劣变及控制途径研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021. [WU X G. Study on quality deterioration and control pathway in the process of pre-conditioning pork jelly storage[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.]
- [27] 宋娟娟, 谢婷, 刘文涵, 等. 丙二醛对豆粕蛋白质氧化的影响及茶多酚的缓解作用[J]. *南京农业大学学报*, 2023, 46(2): 324–332. [SONG J J, XIE T, LIU W H, et al. Effect of malondialdehyde on protein oxidation of soybean meal and relieving effects of tea polyphenols[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2023, 46(2): 324–332.]
- [28] WALAYAT N. 蛋清蛋白/低聚糖复合物对冻藏鱼肌原纤维蛋白结构与性质的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020. [WALAYAT N. Effect of egg albumin/oligosaccharide complex on the structure and properties of myofibrillin in frozen Tibetan fish[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.]
- [29] 朱士臣, 俞杰航, 金燕, 等. 鱼鳞明胶对鱼糜肌原纤维蛋白的

- 冷冻保护作用及其机制[J]. *食品科学*, 2022, 43(24): 16-24. [ZHU S C, YU J H, JIN Y, et al. Cryoprotective effect of fishscale gelatin on fibrin and its mechanism[J]. *Food Science*, 2022, 43(24): 16-24.]
- [30] 李颖畅, 郑婕, 崔蕾, 等. EGCG 和 EGC 对微波加热海鲈鱼鱼片功能特性和蛋白氧化的影响[J]. *中国食品学报*, 2024, 24(1): 179-189. [LI Y C, ZHENG J, CUI L, et al. Effect of EGCG and EGC on the functional properties and protein oxidation of microwave-heated sea bass fillets[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2024, 24(1): 179-189.]
- [31] 韩吉平. 反复冻融对熟制小龙虾感官品质与保水性的影响及改善方法研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2022. [HAN J P. Study on the influence of repeated freezing and thawing on the sensory quality and water retention of cooked crayfish and its improvement method[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2022.]
- [32] ZHAO S, LI Z, LIU Y, et al. High-pressure processing influences the conformation, water distribution, and gel properties of pork myofibrillar proteins containing *Artemisia sphaerocephala* Krasch gum[J]. *Food Chemistry*: X, 2022, 14: 100320-100329.
- [33] 周雪. 光谱学技术探测磺胺类药物与人血清白蛋白的相互作用[D]. 南昌: 南昌大学, 2016. [ZHOU X. Spectroscopy techniques to probe the interaction of sulfonamides with human serum albumin[D]. Nanchang: Nanchang University, 2016.]
- [34] ZHANG D, YANG X, WANG Y, et al. Proanthocyanidin B2 and transglutaminase synergistically improves gel properties of oxidized myofibrillar proteins[J]. *Food Chemistry*, 2022, 391: 133262-133271.
- [35] 黄国, 田泽鹏, 薛丽莹, 等. EGCG 与 β -伴大豆球蛋白/大豆球蛋白相互作用对蛋白质结构的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(12): 1-9. [HUANG G, TIAN Z P, XUE L Y, et al. Effect of EGCG interaction with β -partner/myribulin on protein structure[J]. *Food Science*, 2022, 43(12): 1-9.]
- [36] 薛丽莹, 田泽鹏, 陈若桐, 等. pH 处理对 EGCG 与大豆蛋白相互作用的影响[J]. *食品科技*, 2022, 47(7): 121-128. [XUE L Y, TIAN Z P, CHEN R T, et al. Effect of pH treatment on the interaction between EGCG and soybean protein[J]. *Food Technology*, 2022, 47(7): 121-128.]
- [37] HUANG P, WANG Z, FENG X, et al. Promotion of fishy odor release by phenolic compounds through interactions with myofibrillar protein[J]. *Food Chemistry*, 2022, 387: 132852.
- [38] LI K, FU L, ZHAO Y Y, et al. Use of high-intensity ultrasound to improve emulsifying properties of chicken myofibrillar protein and enhance the rheological properties and stability of the emulsion[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 98: 105275-105285.
- [39] 赵冰, 李素, 张顺亮, 等. 蛋白氧化对肌原纤维蛋白凝胶构效关系的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(3): 55-61. [ZHAO B, LI S, ZHANG S L, et al. Effect of protein oxidation on the structure-activity relationship of myofibrillar protein gel[J]. *Food Science*, 2018, 39(3): 55-61.]
- [40] 郭亚晶, 刘昆仑. 脂质氧化产物-蛋白质相互作用研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(13): 5327-5332. [GUO Y J, LIU K L. Progress in studying lipid oxidation product-protein interactions[J]. *Journal of Food Safety and Quality Testing*, 2021, 12(13): 5327-5332.]
- [41] PAN L, CHEN J Y, FU H H, et al. Effects of fabrication of conjugates between different polyphenols and bovine bone proteins on their structural and functional properties[J]. *Food Bioscience*, 2023, 52: 102375.
- [42] 张敏. 乳清多肽对反复冻融猪肉糜凝胶特性和肌原纤维蛋白氧化的影响[D]. 烟台: 烟台大学, 2021. [ZHANG M. Effect of whey peptide on chyme gel properties and myofibrillin oxidation in repeated frozen-thawed pork[D]. Yantai: Yantai University, 2021.]
- [43] 沈双伟, 李登龙, 林伟玲, 等. 桑椹多酚及其微胶囊对猪肉脯品质的改良[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(3): 185-194. [SHEN S W, LI D L, LIN W L, et al. Improvement of pork breast quality by mulberry polyphenols and their microcapsules[J]. *Modern Food Technology*, 2022, 38(3): 185-194.]